

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola Összehasonlító Neurobiológia Program

A hisztamin erg rendszer a fejlődő és kifejlett Gastropoda (*He/ix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*) idegrendszerben

PhD értekezés

Hegedűs Endre

Témavezető:

Dr. Elekes Károly
a biológia tudomány doktora

PÉCS, 2004

1. BEVEZETÉS

A természetesen előforduló hisztamint (HA) 1910-ben írták le Sir Henry Dale és munkatársai. Dale 1907-ben részt vett egy Heidelbergben megrendezett fiziológiai kongresszuson, ahol felkeltette a figyelmét egy beszámoló, melyben leírták, hogy az anyarozsból nyert kivonat kontrakciót vált ki a macska méhének simaizomzatán. Az anyarozs kivonat addig azonosított összetevőinek hasonló hatását nem ismerték, ezért Dale és munkatársa, a biokémikus George Barger megkísérelték izolálni és azonosítani a kérdéses komponenst, valamint leírni annak fiziológiai hatásait. Nem sokkal rá sikerrel jártak, azt találták, hogy a kérdéses anyag a α -iminazoletilamin, a hisztidin egy származéka.

A α -iminazol-etilamin - azaz a HA - nem volt teljesen ismeretlen vegyület, korábban laboratóriumi úton már elő állították, azonban természetes előfordulásáról addig senki sem számolt be. Dale és Barger felfedezése, majd egy röviddel ezután kifejlesztett technika, mely baktériumok felhasználása révén tette lehetővé az amin nagy mennyiségben történő előállítását, más kutatókat is arra sarkallt, hogy megvizsgálják e biogén amin kémiai, fiziológiai és farmakológiai sajátosságait.

Kutatásaikat tovább folytatva a HA többféle folyamatban betöltött szerepére derült fény. 1913-ban közzétették, hogy a HA a simaizmok anafilaktikus összehúzódásáért is felelős. Az azóta eltelt idő során a HA az egyik legfontosabb biogén aminként vált ismertté a biológiában és a gyógyászatban. Három, régóta jól ismert farmakológiai hatása - simaizmok összehúzódása, vaszkuláris permeabilitás növe

lése, gyomorsavszekréció serkentése - mellett kiderült, hogy a HA szerepet játszik a neurotransmisszióban, az immunmodulációban, a sejtproliferáció szabályozásában, hogy csak a legfontosabbakat említsük.

1.1. HA agerincsek idegrendszerében

A HA mind a központi (CNS) mind a perifériás idegrendszer (PNS) szintjén egy széles hatásspektrummal rendelkező amin. A HA az 1-es, 2-es, 3-as és 4-es típusú HA-receptorok (HIR, H2R, H3R és H4R) közvetítésével különböző fiziológiai folyamatok szabályozásában vesz részt. Ezek közül kiemelendő az allergiás ornyálkahártya-gyulladásban és csalánkiütésben játszott szerepe. Sokáig azt gondolták, hogy a HA egy káros, ártalmas mediátor anyag. Azóta kiderült, hogy fontos szerepet játszik az agy homeosztázisában.

HAerg neuronokat először immunhisztokémiai módszerrel azonosítottak, markerként a hisztidin-dekarboxiláz (HDK, a HA szintézisét katalizáló enzim) ellen előállított ellenanyagot alkalmazták. Ebben a vizsgálatban a HDK-ban gazdag méhlepényből különítették el az enzimet, és ez ellen termeltettek ellenanyagot. Közvetlenül a HA ellen kifejlesztett ellenanyag alkalmazásával először patkány CNSében tettek láthatóvá HA-tartalmú neuronokat

A gerincesek HAerg idegsejtjeinek általános neuroanatómiai jellemzőit és különféle fiziológiai funkcióit széleskörű morfológiai és farmakológiai vizsgálatok során derítették fel. Az összegyűlt neurofarmakológiai és viselkedéstan vizsgálatok alapján világossá vált, hogy a HA szerepet játszik az arousal, az alvás-ébrenlét ciklus, a táplálékfelvétel, a tanulás és memória, az agresszív viselkedés és az emóciókontrolljában.

1.2. HA a gerinctelenek idegrendszerében

Gerinctelen fajok idegrendszerében, illetve egyedi idegsejtjeiben biokémiai mérésekkel jelentős HA koncentrációkat mutattak ki. Puhatestűekben, a Gastropoda osztályon belül a HAerg rendszert mindenek előtt a tengeri nyúl, *Aplysia californica* idegrendszerében vizsgálták. Kimutatták a HA-szintézis és -metabolizmus, valamint egy aktív HA transzport mechanizmus jelenlétét. Ugyancsak ebben a fajban jelentős HA koncentrációkat mértek mind egyes azonosított idegsejtekben, mind az összes központi idegdúcban. Az *Aplysia* CNS-ének idegsejtjei közül a fejdúc C2 neuronját részletekbe menően tanulmányozták. Ez az azonosított HAerg idegsejt mechanoszenzoros információkat fogad az állat ajkából. Szinaptikus kimenetei - melyek egyrészt modulátoros jellegűek, másrészt közvetlenül befolyásolják egyes motoneuronok működését - részt vesznek a táplálékosztási viselkedés kialakításában és szabályozásában.

Egy másik Gastropoda faj, az éti csiga (*Helix pomatia*) izolált idegdúcaiban szintén kimutatták a HA felvételét és felszabadulását. Az idegdúcok 14C-HA tartalmú médiumban történő inkubálását követően kimutatták, hogy a felvett amin metabolizmusa igen gyors folyamat. Igazolták, hogy a HA felvétele egy aktív, különböző farmakonokkal részben gátlható transzport rendszeren keresztül történik.

Elektrofiziológiai kísérletek során *Aplysia*-ban szinaptikus úton közvetített válaszokat tudtak elvezetni a követő idegsejtekből, amikor HAerg neuronokat stimuláltak, és ezt a jelenséget exogén HA alkalmazásával is ki tudták váltani.

A HA jelátvivő szerepét rovarok látórendszerében egyértelműen bizonyították. Azt is kimutatták, hogy a fotoreceptorokban mért magas HA koncentráció összefüggésben van a HA-nak a látó lebeny lamina rétegének monopoláris sejtjeire gyakorolt erőteljes hatásával. A kékfejű dongólegy (*Calliphora erythrocephala*) optikus lebenye lamina rétegének enzimatikusan disszociált nagyméretű monopoláris sejtjein (melyek a fotoreceptoroktól kapnak bemeneteket) patch-clamp kísérleteket végezve azt találták, hogy a sejtet többségében erős áramokat váltott ki a HA, amely Cl⁻-csatornákat aktiválva vesz részt az ingerületátvitelben.

A HA immuncitokémiai lokalizációját specifikus anti-HA ellenanyag alkalmazásával gerinctelenek közül legrészletesebben ugyancsak különböző ízeltlábúfajok idegrendszerében írták le. Ennek során kimutatták, hogy HA-IR idegsejtek nem csak a látórendszerben, hanem az agy ganglionáris alegységeiben is előfordulnak, ezzel alá támasztva a HA integratív folyamatokban betöltött széleskörű szerepét.

Gastropodákban a HA-immunreaktív (HA-IR) elemek eloszlását az *Aplysia californica* és *Pleurobranchaea californica*

CNS-ében, illetve a fej- és pofadúcok által beidegzett perifériás szövetekben térképezték fel. Kimutatták, hogy HA-tartalmú idegsejtek valamennyi CNS-beli idegdúcban jelen vannak. Mindkét faj esetében különösen sűrű HA-IR idegrost hálózatot írtak le a pofadúc neuropil állományában. Számos, a fej- és pofadúcból eredő perifériás idegben is megfigyeltek HAerg elemeket, csakúgy, mint az ezek által beidegzett perifériás szövetekben (radula, tapogató, felső ajak). HA-IR érző idegsejteket mutattak ki a *Pleurobranchaea* és az *Aplysia*, valamint a *Biomphalaria glabrata* édesvízi tüdőscsiga faj statocystáiban. A statocysta a lábdúcokat körülvevő kötőszövetes burokból elhelyezkedő, gömb alakú, folyadékkal töltött, páros egyensúlyozó szerv, melynek érző sejtjei (ún. szőrsejtek) az állat pozíciójával, mozgásával kapcsolatos információkat küldenek a fejdúcba.

A HA eloszlásáról és celluláris lokalizációjáról a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) és az éti csiga (*He/ix pomatia*) idegrendszerében eddig csak minimális információ állt rendelkezésre. Ezzel éles ellentétben a monoamin-tartalmú idegsejtek kémiai-neuroanatómiáját, lokalizációját és a különböző monoaminok (szerotonin, dopamin, oktopamin) koncentrációját részletesen vizsgálták a két faj idegrendszerében. Szerotonin- és dopamin-tartalmú, efferens- és interneuronok viszonylag nagy populációját mutatták ki, kvantifikálták és jellemezték anatómiaiailag a CNS-ben. Ezzel szemben az oktopaminerg rendszert csak kis számú központi interneuron alkotja. Ezek az eredmények jelentős mértékben hozzájárultak azokhoz a funkcionális vizsgálatokhoz, melyek során a fenti monoaminok szerepét tanulmányozták az összehasonlító neurobiológia e fontos modellállatainak viselkedését (táplálkozás, légzés) szabályozó folyamatokban.

1.3. A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) egyedfejlődése

A fejlődő idegsejtek transzmitter expresszióját elemző vizsgálatokat a gerinctelen neurobiológia számos modell állatán végeztek, és végeznek napjainkban is.

A *Lymnaea* egyedfejlődését a zigóta fejlettségi állapotól a kifejlett forma eléréséig egy zárt, szikanyaggal teli glükoproteid tokban tölti. A folyamat 240C hőmérsékleten nagyjából 8 napig tart. Az utóbbi évtizedek során jelentős ismeretanyag gyűlt össze ezen édesvízi csigafaj morfo- és organogenezisééről. A *Lymnaea* embrionális fejlődésének számos jellemzője alkalmassá teszi ezt a fajt embriológiai vizsgálatok végzésére. Az állat tartása egyszerű, könnyen szaporítható, az embrió fejlődése jól nyomon követhető, mivel a folyamat az átlátszó peteburkon belül megy végbe. Az embrionális fejlődés egyes stádiumai az embriók mérete, egyes szervek (pl. szív), testrészek megjelenése, illetve egyes perifériás területek (szem, kültakaró) pigmentációjának kezdete alapján jól és biztosan beazonosíthatók.

A tokot elhagyó juvenilis állat testfelépítésében lényegében megegyezik a felnőtt állattal. Eltérést a felnőtt formától a test méretében mutat, emellett a tokot elhagyó egyedek ivaréretlenek (juvenilis egyedek). Ivarérettségüket a kikelést követő 2-3 hónap során, 1,5-2,0 cm-es testméretnél érik el.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A tüdőscsigák 2 modellfaja - a *He/ix pomatia* és a *Lymnaea stagnalis* - HAerg rendszerével kapcsolatban csak nagyon korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. Ezért munkánk célja egyrészt az volt, hogy immuncitokémiai, biokémiai, elektrofiziológiai és magatartás-vizsgálati módszerek segítségével részletesen elemezzük a *He/ix pomatia* és a *Lymnaea stagnalis* központi és perifériás idegrendszerében a HAerg mrvivőrendszert. Célul tűztük ki, hogy:

- (i) leírjuk a CNS és a rNS HA-tartalmú idegsejtjeinek térbeli megoszlását, projekcióit és innervációs mintázatát,
- (ii) meghatározzuk a HAerg rendszer bizonyos neurokémiai jellemzőit (HAkoncentráció értékek, HA-felvételi és -felszabadulási folyamatok),
- (iii) fiziológiailag azonosított központi neuronokon vizsgáljuk a HA hatásait,
- (iv) és leírjuk a HA egyes magatartásformákra (mozgás) gyakorolt hatását.

A felnőtt állatok idegrendszerén végzett vizsgálatok mellett célunk volt a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* embrióiban és juvenilis egyedeiben a HAerg rendszer kialakulásának leírása is, különös tekintettel a HAerg neuronok megoszlásának tér- és időbeli mintázatára. E vizsgálataink magukban foglalták:

- (i) a HAerg neuronok CNS-beli megjelenésének és eloszlásának immuncitokémiai módszerekkel végzett pontos meghatározását az egyedfejlődés során,
- (ii) valamint a különböző fejlődési állapotokban a HA koncentráció értékek biokémiai úton történő meghatározását.

Vizsgálatainkkal egyrészt fényt kívántunk deríteni a HA jelátvivő szerepére a Gastropoda fajok idegrendszerében, valamint neuromorfológiai alapokat teremteni további vizsgálatokhoz, melyek a HAerg rendszernek az egyedfejlődés során, továbbá egyes szabályozó folyamatokban és magatartásformák kialakításában betöltött szerepének részletes elemzésére irányulnak. Másrészt

teljesebbé kívántuk tenni a Gastropodák aminerg rendszereivel kapcsolatos ismereteinket.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok

Kifejlett *Helix pomatia* és *Lymnaea stagnalis* egyedeket (40-40 állat mindkét fajból) használtunk. A *Helix* egyedeket tavasszal, nyáron és kora ősszel gyűjtöttük Tihanyban, ezután a laboratóriumban, vagy természetes körülmények között, az intézet parkjában tartottuk őket. A *Lymnaea* egyedeket a Kis-Balaton tározóból gyűjtöttük, majd levegőztetett, átfolyó Balaton-vízes akváriumokban tartottuk őket. Az embriológiai vizsgálatok során felhasznált *Lymnaea* embriók a laboratóriumi tenyésztünkben lerakott embriócsomókból származtak.

3.2. Szövetelőkészítés

A garatkörüli dúckomplexet, a pofadúcokat és a különböző perifériás szöveteket (ajak, talp, tapogató, nyálmirigy, bukkális massa, szív) gyorsan kiboncoltuk, és frissen készített, 4% 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimidet (EDAC, Sigma) és 0.4% N-hidroxisukcinimidet (NHS, Sigma) tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferben (PB) rögzítettük 40C-on, 4 órán át. Néhány esetben a fixálást 2% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó foszfát-puffer - fiziológiás só (0,9% NaCl) oldatban (PBS, 0,1 M, pH:7,4) folytattuk 40C-on, 4 órán át. Rögzítés után a ganglionokat többször alaposan átmostuk 0,1 M PB-ben. A mosás alatt a who lemount immuncitokémiára szánt idegdúcok kötőszövetes burkát eltávolítottuk.

Az embriológiai kísérleteket, illetve a Pl-3 fejlettségű poszt embrionális egyedek vizsgálatát a héjkezdeménytőljhéjtól megfosztott totálpreparátumokon végeztük (Pl-3 poszt embrionális stádiumok esetében a CNS-t még nem tudtuk elkülöníteni a környező szövetektől, P4-6 stádiumokban viszont már a teljes CNS kiboncolható). Az embriókat hegyes csipeszek segítségével kivettük a peteburokból, a héjat és a vizscerális masszát eltávolítottuk. A rögzítést megelőzően az embriók esetében részleges proteolitikus emésztést alkalmaztunk (0,25% XIV. típusú proteáz [Sigma] 0,1 M PBS oldatban) szobahőmérsékleten, 1,5 percen keresztül, az immuncitokémiai reagensek szövetekbe való jobb penetrációját elősegítendő. A preparátumokat ezután a fentebb leírttal megegyező összetételű fixáló oldatban rögzítettük szobahőmérsékleten, 90 percen át, majd ugyancsak 2% PFA-PBS oldatban folytattuk a rögzítést szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Rögzítés után a ganglionokat többször alaposan átmostuk 0,1 M PB-ben.

3.3. Immuncitokémia

A rögzített mintákat 1 éjszakán át 20%-os, PBS-ben oldott szaharóz oldatban 40C-on tartottuk, majd Tissue-Tek fagyasztó közegbe ágyaztuk, kriosztátban fagyasztottuk és metszettük. Az immuncitokémiai kísérleteket a 12-16 µm vastagságú, Cr-Al-zselatinnal fedett tárgylemezre felvett kriosztát sorozatmetszeteken végeztük el. A vizsgált perifériás szövetek közül a *Helix* tapogató it zselatin-albumin keverékbe ágyazott, 2% PFA-PBS oldatban utófixált, 50 µm vastagságú Yibratome-metszeteken is vizsgáltuk. A kísérletek egy további részében totálpreparátumokat is használtunk.

Primer (HA-specifikus) ellenanyagként kacsakagyló (keyhole limpet) hemocyaninhoz (KLH) EDAC-del kapcsolt HA ellen nyúlban termeltetett poliklonális antiszérumot használtunk (DiaSorin, Stillwater, V.S.A., és Karhunen és mtsai., 1993). Az immuncitokémiai jelöléshez a három lépéses peroxidáz-antiperoxidáz (PAP) módszert, illetve a két lépéses indirekt immunfluoreszcens technikát alkalmaztuk. Az embriológiai kísérletekben kizárólag az indirekt fluorezcens technikával dolgoztunk.

A PAP eljárás az alábbi lépésekből állt: (i) 30 perc kezelés szobahőmérsékleten, 0,1 M PB-ben oldott 1 % H2O2 oldatban; (ii) 60 perc kezelés szobahőmérsékleten 0,25% marha szérum albumint (BSA) és 0,25% Triton-X 100-at (TX) tartalmazó foszfát pufferben (PB5); (iii) 16-72 óra inkubáció 40C-on PBS-TX-BSA-ban 1:1000 arányban hígított anti-HA ellenanyaggal; (iv) 5 óra inkubáció szobahőmérsékleten PBS-TX-BSA-ban 1:40 arányban hígított kecske anti-nyúl immunoglobulinnal (GAR, DAKO); (v) 24 óra inkubáció 40C-on PBS-TX-BSA-ban 1:50 arányban hígított peroxidáz-antiperoxidáz (PAP, DAKO). Az immunhisztokémiai reakciót 10 perc időtartamú, szobahőmérsékleten, 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH:7,6) oldott 0,05% 3,3-diaminobenzidín tetrahidrokloridban (DAB, Sigma) történő előinkubálást követően; 0,01 % H2O2 hozzáadásával, 5-25 perc hívással, szobahőmérsékleten tettük láthatóvá.

Az indirekt immunfluoreszcens technika alkalmazása során a fent leírt anti-HA ellenanyaggal történt inkubációt követően PBS-TX-BSA-ban 1:50 arányban hígított, disznó-anti-nyúl immunoglobulinhoz kapcsolt tetrametilrodamin-izotiocianátot (TRITC) alkalmaztunk 5 órán át, szobahőmérsékleten.

A preparátumokat mindkét eljárást követően PBS-ban mostuk, majd Canada balzsammal (Fluka, PAP-módszer), illetve glicerín és PHS 1:1 arányú keverékével (immunfluoreszcens módszer) fedtük le, majd egy megfelelő szűrővel felszerelt Zeiss Axioplan fénymikroszkópban vizsgáltuk és fotografáltuk.

3.3.1. Kontroll

A HA ellenanyag specifitását az 1:1000 arányban hígított primer antitest szukcinilált ovalbuminhoz EDAC-del kapcsolt konjugátumával (HA-saY A) való preabszorpciót követően vizsgáltuk. A preabszorpció 10, 20 és 50 pg/ ml koncentrációjú HA-SOY A oldatokban 40C-on, 24 órán át tartott, majd a fent leírt immuncitokémiai procedúrát hajtottuk végre. Az immunfestődés erősségét 10 pg/ml HA-saY A jelentősen csökkentette, míg a jelölődés a magasabb koncentrációjú (20, 50 pg/ ml) HA-SOY A preabszorpció esetében teljesen eltűnt.

Az elsődleges antitest specifitását korábban más puhatestű fajokon (*Aplysia californica*, *Macama bivalvia*) már ugyancsak

tesztelték és bizonyították.

3.4. Biokémiai kísérletek

3.4.1. HPLC vizsgálatok

A kötőszövetes burok eltávolítását követően a CNS ganglionjait és különböző perifériás szöveteket (talp, ajak, tapogató) 200-200 µl perklórsavban homogenizáltuk, majd HPLC-vel határoztuk meg a minták HA tartalmát. A perklórsavas homogenizátumot lecentrifugáltuk, és a felülúszót CMA/200 automata mintainjektorral (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden) 60 mm hosszúságú TSK-GEL Histaminepak kationcserés oszlopra (TOSOHAAAS) vittük fel, és 0,25 M KH₂PO₄-val eluáltuk, és a detektáláshoz fluoreszcens származékot képeztünk. Az effluent 0,1 % orto-ftáldaldehiddel kevertük össze (OP A, Fluka Chemie), majd egy másik, 2 M NaOH-ot és 0,2 M borátot tartalmazó oldattal, és 450°C-on hajtottuk végre a reakciót, majd 3 M foszforsav hozzáadásával állítottuk le azt, és Merck/Hitachi F-10SO fluoreszcens spektrofotométerrel 450 nm hullámhosszon mértük a fluoreszcens OP A származékokat (gerjesztés: 360 nm hullámhosszon). Merck/Hitachi D-2500 kromatointegrátorral gyűjtöttük és elemeztük az adatokat. A mobil fázist és a három reakcióoldatot Pharmacia LKB 2150 HPLC pumpákkal adagoltuk (Pharmacia LKB Biotechnology).

3.4.2. 3H-HA felvételének vizsgálata

18 *Lymnaea stagnalis*-ból a teljes CNS-t, illetve elkülönítve a pofa-, fej- és lábdúcokat, valamint a visceroparietális dúckomplexet kipreparáltuk. Minden egyes kísérletben (n=3) 3-3 teljes CNS-t és minden elkülönített dúctípusból 3-3 darabot vizsgáltunk. Megmértük a nedves tömegeket, majd az idegdúcokat egyenként 2 ml fiziológiás oldatot tartalmazó küvetákba helyeztük. A preparátumokhoz 0,5-100 pM végkoncentrációban 3H-HA-t ([2,5-3H] hisztamin dihidroklorid, specifikus aktivitás 47 Ci/mmol, Amersham) adtunk, és a ganglionokat rázófürdőben inkubáltuk 5 percig 250°C-on (teljes felvétel), illetve 0°C-on (nemspecifikus felvétel). Az inkubálást az inkubációs elegy GF/C üveg póruszűrőn való átszűrésével állítottuk le, és a ganglionokat háromszor átmostuk 5 ml jéghideg fiziológiás oldatban. Ezt követően a ganglionokat szcintillációs küvetákba helyeztük át és 1 ml szövet szolubilizátorban feloldottuk. A szolubilizálás után 10 ml toluén bázisú szcintillációs oldatot adtunk a mintákhoz, és LKB folyadékszscintillációs műszerrel mértük a radioaktivitást. A specifikus felvételt mint a teljes és a nem-specifikus felvétel közötti különbséget határoztuk meg. Amikor a felvétel gátlását vizsgáltuk, az inkubációs elegy a következő gátló anyagokat tartalmazta 1500 pM koncentrációban: imipramin, dezipramin, benzotropin, fenoxibenzamin és ouabain (RBI, Sigma). A felvétel kinetikai paramétereit és a gátlás IC₅₀ értékeit GraFit számítógépes program segítségével becsültuk.

3.4.3. 3H-HA felszabadulásának mérése

Minden kísérletben 3 *Lymnaea* CNS-t (n=9) inkubáltunk 30 percig 1 ml, 2 pCi 3H-HA-t tartalmazó fiziológiás oldatban. Az inkubálás után a ganglionokat többször átmostuk 20 ml fiziológiás oldatban, majd perfúziós kamrákba helyeztük őket. 15 percen át 1 ml/perc áramlási sebességgel fiziológiás oldatot áramoltattunk át a perfúziós kamrákon, és 1 ml-es frakciókban gyűjtöttük össze az effluentet. Az 1.-4. és 9.-12. frakciók fiziológiás oldatot, az 5.-8. frakciók megemelt, 100 mM K⁺-ot tartalmazó fiziológiás oldatot tartalmaztak. Párhuzamos kísérletekben a perfúziót Ca²⁺-mentes fiziológiás oldattal végeztük, a Ca²⁺-ot szukrózzal helyettesítettük.

3.5. Elektrofiziológiai vizsgálatok

A voltage-clamp kísérleteket egyrészt a *Helix* jobboldali mezocerebrumának és a *Lymnaea* fejdúca anterior lebenyének nagyméretű (70-80 µm) idegsejtjein, másrészt mindkét faj bukkális ganglionjának B2 idegsejtjein végeztük. Ezeket a neuronokat egyrészt annak alapján választottuk ki, hogy nem mutattak HA-immunreaktivitást, másrészt mindkét esetben funkcionálisan azonosított neuron(csoport)okról volt szó. A mezocerebrum, illetve az anterior lebeny idegsejtjei a reprodukciós magatartás kivitelezésében játszanak szerepet, míg a pofadúc B2 idegsejtje a táplálkozási magatartást meghatározó neuronhálózat efferens eleme. Az intracelluláris elektródákat boroszilikát üveg kapillárisokból, Kopf vertikális elektródahúzóval használva (WPI) húztuk ki. A feszültség- és áraminjektáló elektródákat 2 M K-acetát oldattal töltöttük meg, ellenállásuk 2-8 MΩ között volt.

Az intracelluláris jeleket Axoclamp 2B erősítővel (Axon Instruments) erősítettük fel, 1 kHz-nél szűrtük (3 dB, 4 pólusú Bessel szűrő), digitalizáltuk (Digidata 1200, Axon Instruments) és egyenként merevlemezen tároltuk. A feszültség pulzus protokollokat szoftverrel (pClamp 5.7.7., Axon Instruments) generáltuk, melyet az adatok elemzésénél is használtunk. A HA-t 10-20 pM végátmérőjű vegyepipettákból nyomással injektáltuk (picospicer II, General Value), a pipettákat a sejttesttől 50-200 µm távolságra pozícionáltuk. A válasz kiváltásához 10-3 M HA-t adtunk rövid, különböző időtartamú (0,1-0,5 s) nyomásimpulzusokkal (2 bar). A mintákat folyamatosan, 1-1,5 ml/perc sebességgel perfundáltattuk, következésképpen nem ismertük a HA pontos koncentrációját a sejttest környezetében. A HA-t a következő összetételű fiziológiás oldatban oldottuk fel: 80 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4, *Helix pomatia*), illetve 45 mM NaCl, 1,7 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (pH 7,7, *Lymnaea stagnalis*). A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. Az adatokat a :f: S.E.M. átlagaként adtuk meg.

3.6. Viselkedési (mozgás) teszt

A HA-nak a talp csillóinak mozgására kifejtett lehetséges hatását egy nemrégiben leírt módszer alapján elemeztük, a *Lymnaea* egyedek mozgásának nyomon követésével. A csigákat egyenként 600 ml Balaton-víz tartalmazó, speciális alakú akváriumokba helyeztük,

melyekben csak kétdimenziós (fel/le és oldalirányú) mozgásuk volt lehetséges. Az egyes akváriumokhoz 10-3, 10-4 és 10-5 M végkoncentrációban HA-t adtunk, és elemeztük a mozgásaktivitásukban bekövetkező változásokat. Az állatok akváriumfalon történő mozgását videokamerával rögzítettük, a következő időrendben: 30 perc kontroll felvétel tiszta Balaton-vízben, 120 perc felvétele HA jelenlétében, 120 perc HA jelenlétében videófelvétel nélkül, végül 30 perc felvétel HA jelenlétében. A HA hatásának elemzésekor összehasonlítottuk a csigák által a kontroll ideje és a HA jelenléte alatt az akváriumok falán megtett távolságokat. A 10-3, illetve 10-4 M koncentrációban alkalmazott HA hatása nem volt egyértelmű, serkentő és gátló hatást egyaránt tapasztaltunk. 10-5 M HA koncentráció bizonyult optimálisnak és a leghatékonyabbnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A HAerg neuronok megjelenése és eloszlása a *Lymnaea* embriogeneze során

Az 50%-osnál (E50%) alacsonyabb embrionális fejlettségű egyedekben nem lehetett immunreaktivitást detektálni. A HA immunreaktivitás legelőször az E55% fejlettségi állapotú (metamorfózis) embriók CNS-ében jelent meg. Ebben a korai fejlettségi állapotban, amikor az idegsejtek éppen csak megkezdik proliferációjukat a központi idegdúcokban belül, három, intenzíven jelölődő, kétoldali szimmetriát mutató sejtpárt találtunk az embriók antero-dorzális részében, azokon a területeken, amelyek a később kialakuló fejdúcoknak felelnek meg. A HA-IR neuronok morfológiája és mérete hasonló volt: kis méretű (átmérő: 12-20 pm), unipoláris sejtek, melyek axon-nyúlványait a fejlődő idegdúcokon keresztül a kialakulóban lévő cerebrális kommisszúrába és a cerebro-pedális konnektívumokba küldték. Ugyanakkor már a HAerg rendszer e korai fejlettségi állapotában is tisztán azonosítható volt a cerebro-pedális hurok. A fejlődő konnektívumban jelölt axonnyúlványok futottak.

E65% fejlettségi állapotban (posztmetamorfotikus, felnőtthez hasonló alak) a lábdúcokban megjelent az első HA-IR sejtpár. A bilaterális szimmetriájú sejtpár morfológiája és mérete hasonló volt a fejdúcokban találtakéhoz. A cerebrális és pedális kommisszúrák, valamint a cerebro-pedális konnektívumok a fenti idegsejtekből eredő, jelölt nyúlványokat tartalmaztak.

Egy nappal a peteburokból való kikelést megelőzően, E90% embrionális fejlettségnél a fentiek mellett egy további HA-IR sejtpár jelent meg a lábdúcokban, és két pár jelölődött idegsejtet figyeltünk meg a pofadúcokban. Ezek a sejtek jelentették a *Lymnaea* embriogenezésének teljes időtartama alatt megjelenő utolsó HA-IR neuronokat. HA-IR nyúlványokat a bukkális kommisszúrában is sikerült kimutatni.

A *Lymnaea stagnalis* embriók fejlődő CNS-ében tehát összesen 14 HAerg neuront írtunk le, melyek kizárólag a fej-, láb- és pofadúcokban fordultak elő. Az embriogenezis időtartama alatt a fali-, köpeny- vagy zsigerdúcokban nem voltak jelen HA-IR sejtek, ezekben az idegdúcokban csak egyes jelölt rostok gyenge arborizációja fordult elő. Perifériás projekciók vagy sejtek nem jelölődtek az anti-HA ellenanyaggal, a kis számú HA-IR neuronpopuláció tagjainak axonnyúlványai a peteburokból való kikelésig nem hagyták el a CNS területét.

4.2. Az embrionális *Lymnaea* egyedek HA-tartalma

A HA koncentrációkat - immuncitokémiai eredményeinket figyelembe véve E50-55% és E100% embrionális fejlettségi stádiumok között. Az E55% fejlettségi állapotban, amikor az első HA-IR sejtek megjelentek, igen alacsony koncentrációban (0,66 : 0,08 pmol/mg szövet) tudtunk HA-t mérni. Az alacsony értékek a következő 3 fejlődési stádiumban nem változtak jelentősen (0,57 : 0,84 pmol/mg szövet), ezzel szemben E90% stádiumban a HA tartalom gyors növekedését (1,17 : 0,14 pmol/mg szövet) figyeltük meg, amit az E95% (1,9 : 0,2 pmol/mg szövet) és E100% (1,76 : 0,1 pmol/mg szövet) fejlettségi állapotokhoz tartozó magasabb értékek követtek. Ezek az értékek összhangban állnak immuncitokémiai vizsgálataink eredményével, vagyis az embrionális HA-IR idegsejtek számának alakulásával, és a központi idegdúcok neuropil állományában megfigyelhető HA-IR idegrostok számának növekedésével.

4.3. A HAerg rendszer fejlődése a juvenilis *Lymnaea* egyedekben

A HA-IR idegsejtek száma a peteburok elhagyását követő posztembrionális fejlődési stádiumokban (P1-2) az E100% embrionális fejlettségi állapothoz képest nem mutatott lényegi változást. A pofa- és fejdúcokban nem változott a jelölt sejtek száma, viszont a lábdúcokban további kis és közepes méretű (átmérő: 15-40 pm) HA-IR sejtek jelentek meg a cerebro-pedális konnektívum eredésének közelében. Az említett idegdúcok neuropil állományát gazdagon innerválták jelölt axonnyúlványok. A többi idegdúcban (köpeny-, fali- és zsigerdúcok) nem találtunk HA-IR sejteket, e dúcok neuropil régiója is csak gyenge HA-IR beidegzést mutatott. Az embriogenezis során a PNS-ben nem találtunk HA-IR idegelemeket, de a statocysták érző sejtjei már közvetlenül a kikelés után erős immunpozitivitást mutattak, ami a statocystáknak a szabad mozgás koordinálásában betöltött fontos szerepét jelzi. A statocysták szőrsejtjei mellett a talp erős HA-IR innervációját is megfigyeltük.

A következő posztembrionális fejlődési stádiumokban (P3-4) a pofa- és lábdúcokban jelentős sejtsszámnövekedést figyeltünk meg, míg a többi idegdúcban nem tapasztaltunk hasonló változást. A ganglionok és az azokat egymással összekapcsoló konnektívumok és kommisszúrák HA-IR beidegzettsége még kifeje

zettebbé vált. A sejtszámnövekedés mellett ez a jelenség is magyarázhatja a P2-3 stádiumokban HPLC technikával mért magas HA-tartalmat.

A PS-6 fejlődési állapotok végére a HAerg rendszer megközelíti a felnőtt egyedekben megfigyelt fejlettséget, neuronszámot és -eloszlást. A pofa- és lábdúcok mellett a fejdúcokban is a HA-IR sejtszám további jelentős gyarapodása következett be, emellett a zsigerdúcban és a fali dúcokban is megjelentek a felnőtt CNS-ben is megtalálható, magányosan elhelyezkedő, közepes méretű HA-IR sejtek. Az egyes idegdúcok, konnektívumok és kommisszúrák is sűrű, varikózus HA-IR rostrendszert tartalmaztak.

4.4. A posztembrionális *Lymnaea* egyedek HA-tartalma

A HA-tartalom a P1 stádiumban (3,32 pmol HA/mg szövet) nem mutatott lényeges változást a pete burok elhagyásakor mért értékhez képest, és ez összhangban áll immuncitokémiai vizsgálataink eredményeivel. A HA-tartalomban a P2 stádium során figyeltünk meg egy hirtelen bekövetkező, gyors növekedést (9,23 pmol HA/mg szövet), ami egybe esik a P2-3 stádiumokban megfigyelt sejtszámnövekedéssel, illetve az egyes idegdúcok neuropil régióiban, és a talpban megjelenő erős HA-IR beidegzettséggel. A P3 stádiumot követően a HA-tartalom relatív csökkenése figyelhető meg (P6: 1,44 pmol HA/ mg szövet), amire a juvenilis állatok testméretének gyors növekedése szolgálhat magyarázatul.

4.5.1. A **HA-IR** neuronok eloszlása a kifejlett (felnőtt) *Helix* és *Lymnaea* központi idegrendszerében

Az anti-HA ellenanyaggal való inkubálást követően mindkét faj CNS-ében nagy számú idegsejt, és varikózus idegrostok sűrű hálózata mutatott intenzív immunreaktivitást. A két faj között ugyanakkor eltérés figyelhető meg a HA-IR neuronok számában, amennyiben lényegesen nagyobb számú, mintegy 400 HA-IR idegsejt volt jelen a *Helix* CNS-ében, míg a *Lymnaea* CNS-ben csak mintegy 130 HAIR idegsejt fordult elő. A HA-IR neuronok száma a *Helix* és *Lymnaea* CNS egyes ganglionjaiban jelentős eltérést mutatott: míg a *Lymnaea* baloldali köpenydúca 1,

addig a *Helix* jobb és bal lábdúcai 90 jelölt sejtet tartalmaztak. A jelölt sejtek többsége kis méretű (átmérő: 12-30 μ m) volt, de közepes (40-60 μ m) és nagy méretű (70-90 μ m) neuronok is előfordultak. A HA-IR idegsejtek eloszlási mintázata hasonló volt a *Helix* és *Lymnaea* CNS-ében, és az alábbi közös tulajdonságokkal jellemezhető:

- (i) a *Lymnaea* baloldali fali- és jobb oldali köpenydúca kivételével minden idegdúc tartalmazott HA-IR idegsejteket;
- (ii) a HA-IR idegsejtek többsége a pofa-, fej- és lábdúcaiban lokalizálódott;
- (iii) a jelölt neuronok többségének eloszlása szimmetrikus volt;
- (iv) a jellemzően a CNS dorzális felszíne közelében elhelyezkedő HA-IR idegsejtek többsége sejtcsoportokat alkotott az egyes idegdúcokon belül;
- (v) az idegdúcok neuropil állománya gazdagon innervált varikózus jelölt rostokkal, a főbb perifériás idegek, az idegdúcokat összekötő konnektívumok és kommisszúrák is számos HA-IR idegrostot tartalmaztak;
- (vi) a CNS-t körülvevő kötőszövetes burok nem tartalmazott HA-IR idegelemeket.

4.5.1.1. Pofadúcok

A *Helix* pofadúcai 35-39 immunreaktív neuront tartalmaztak, ami a CNS-ben található teljes HA-IR sejtpopuláció mintegy 10%-ának felel meg. Mindkét pofadúc középső részén egy kis méretű (20-30 μ m) HA-IR sejtekből álló csoportot találtunk, melyeket körülbelül 12-12 sejt alkotott. Ezen felül mintegy 15 jelölt sejt lokalizálódott mind a jobb, mind a baloldali pofadúcban. Ezek közül 2 nagy méretű (70-90 μ m) neuron és egy szimmetrikus elhelyezkedésű sejtcsoport pár volt jelen a bukkális kommisszúra közelében. További jelölt neuronok magányosan fordultak elő a különböző perifériás idegek (garat- és pofaidegek) eredésénél. Az összes jelölt sejt a ganglionok dorzális felszínén helyezkedett el. A neuronok egy része az ellenoldali pofadúcba is projiciált, ahol kiterjedt jelölt rostrendszert alakítottak ki a bukkális kommisszúrában. Anyálmirigyet beidegző ideg kivételével a perifériás idegekben számos immunpozitív axonnyúlvány futott.

A *Lymnaea* pofadúcai összesen 33-37 HA-IR neuront tartalmaztak, ami a CNSben kimutatott jelölt sejtek mintegy 30%-át teszi ki. A HA-IR idegsejtek aszimmetrikus eloszlást mutattak, közülük 15 a jobb, 22 a baloldali pofadúcban található. A jelölt sejtek többsége két sejtcsoport párban helyezkedett el, egyikük a dorzális felszínén, közel a kommisszúrához, másikuk a ventrális felszínén, a cerebro-bukkális konnektívum eredésének közelében. További kis és közepes méretű sejtek fordultak elő magányosan vagy párokban az idegdúcokban, valamint a kötőszövetes burokba ágyazott cerebro-bukkális konnektívumokban, a perifériás (dorzo-, latero- és ventrobukkális) idegek eredésének közelében. A neuropil állományok, a bukkális kommisszúra, a cerebro-bukkális konnektívumok és a perifériás idegek – a nyálmirigyet ellátó ideg kivételével – nagy számú jelölt idegrostot tartalmaztak.

4.5.1.2. Fejdúcok

A *Helix pomatia* teljes HA-IR sejtpopulációjának közel egy harmadát (118-136 neuron) a fejdúcokban mutattuk ki. A sejtek többsége kicsi vagy közepes méretű volt (12-60 μ m), és a protocerebrum kivételével a fej dúcok valamennyi alegységében előfordultak. Összesen 8, egyenként 3-15 sejtől álló sejtcsoportot tudunk megkülönböztetni mindkét idegdúcban, ezek szimmetrikus eloszlást mutatva a dorzális felszínen helyezkedtek el, egy, a ventrális felszínen található sejtcsoport kivételével. Emellett 4 magányos neuront találtunk a ventrális felszín közelében. A legintenzívebb immunjelölődést a mezo- és metacerebrum sejtcsoportjai, illetve a posztocerebrum rectális lebenyének sejtcsoportjai mutatták. Emellett kis HA-IR sejtcsoportokat találtunk a pleurális lebenyekben. A korábban szerotonergként azonosított MGC óriásidegsejt csak az esetek egy részében mutatott jelölődést. A neuropil állományba vetítő idegsejtek varikózus rostok sűrű hálózatát alakították ki, míg a kommisszúrában, a cerebro-pleurális és cerebro-pedális konnektívumokban vékony jelölődött rostok kötegek voltak láthatóak, csakúgy, mint az ajak- és tapogatóidegekben.

A *Lymnaea stagnalis* CNS teljes HA-IR sejtpopulációjának 30%-a (36-43 sejt) található a cerebrális ganglionokban. E neuronok többsége szimmetrikus sejtcsoportokban helyezkedett el a ventrális és a dorzális felszínen. További magányos idegsejteket és kis sejtcsoportokat találtunk a cerebrális kommisszúra, a cerebro-pedális konnektívumok és a perifériás ajakidegek eredésénél. A *Helix*-hez hasonlóan a neuropil, a cerebrális kommisszúra és a perifériás (ajak-, tapogató-) idegek erősen jelölődött rostokat tartalmaztak.

4.5.1.3. Lábdúcok

A *Helix* CNS lábdúcai tartalmazták a legnagyobb számú (159-180) HA-IR idegsejtet (a teljes HA-IR sejtpopuláció csaknem felét, 45%-át). A kisméretű sejtek három elkülönült sejtcsoportba rendeződve a ganglionok latero-dorzális régiójában helyezkedtek el. Ezek a *Helix* CNS-ben előforduló legnagyobb tagszámú sejtcsoportok, egyenként 30-32 neuront tartalmaztak. A jelölt idegsejtek vékony rostokkal projiciáltak a neuropilbe, ahol sűrű, varikózus rostrendszert alakítottak ki.

A *Lymnaea* lábdúcaiban összesen 39-45, közepes méretű (40-60 μ m) idegsejt mutatott HA immunreaktivitást (a teljes HA-IR sejtpopuláció mintegy 30%-a). Ezek a neuronok szimmetrikus sejtcsoportokba rendeződtek. Mindkét idegdúcban két jelölt sejtcsoportot figyeltünk meg a dorzális felszínen, a középső- és alsó rectális idegek eredésénél, és egy harmadik csoportot találtunk a dúcok poszterior régiójának ventrális felszínén. Mindkét faj lábdúcainak neuropil állományában immunreaktív idegrostok sűrű hálózatát írtuk le, továbbá jelölt axonokat, illetve axonkötegeket láttunk a rectális kommisszúrában, a cerebro-pedális és pedális-parietális konnektívumokban, és a rectális idegek eredésénél.

4.5.1.4. Viscero-parietális dúckomplex

A *Helix* viscero-parietális dúckomplexét kialakító különböző ganglionokban összesen 43-47 jelölt sejt, a teljes HA-IR idegsejt populáció 11 %-a található. E sejtek eloszlása többségében aszimmetrikus, kis és közepes méretű (20-60 J.lm) sejteket találtunk, melyek magányosan vagy kisebb csoportokban helyezkedtek el a különböző ganglionok dorzális felszínén, négy magányos HA-IR neuront kivételével, melyek ventrálisan helyezkedtek el a jobb és baloldali falidúcokban. A jobb és bal oldali köpenydúcokban, a pleuro-cerebrális konnektívum eredésénél egy szimmetrikusan elhelyezkedő HA-IR sejtcsoportot figyeltünk meg, továbbá magányos, vagy párban elhelyezkedő sejtek fordultak elő a falidúcok közelében. A falidúcok körülbelül 20 jelölt idegsejtet tartalmaztak, ezek többsége (15-16 sejt) a baloldali falidúcban volt található, a jobb oldali falidúcban egy kis sejtcsoportot és két magányos idegsejtet találtunk. A zsigerdúcban kis számú (10-12) HA-IR idegsejt fordult elő, többségük a ganglion külső szélei mentén, 3 kis sejtcsoportban koncentráldott, és egy magányos, nagy méretű (70-90 J.lm) sejt helyezkedett el az egyik sejtcsoport mellett. A különböző idegdúcok neuropil állománya, és a ganglionokból kilépő perifériás idegek nagyszámú HA-IR axonnyúlányt tartalmaztak.

A *Lymnaea* viscero-parietális dúckomplexében 7-9 jelölt sejt, az összes HA-IR neuron kevesebb, mint 10%-a volt található. Ezek a sejtek egymástól különállóan helyezkedtek el a jobb oldali fali-, a baloldali köpeny- és a zsigerdúcokban. A jobb oldali köpeny- és baloldali falidúcok nem tartalmaztak HA-IR idegsejteket. A bal oldali köpenydúcban egy magányos, közepes méretű jelölt idegsejt helyezkedett el a cerebro-pleurális konnektívum eredésének közelében. A jobb oldali falidúcban 4 közepes méretű (40-60 J.lm) jelölt sejt fordult elő, és négy másik volt jelen a zsigerdúcban. A CNS többi részéhez hasonlóan ezen idegdúcok neuropilje is gazdag HA-IR beidegzést mutatott, és a dúckomplex egyes tagjait egymással és a feji-, illetve lábdúcokkal összekapcsoló konnektívumokban is jelölt rostrendszert írtunk le.

4.5.2. A HA-IR neuronok eloszlása a kifejlett (felnőtt) *Helix* és *Lymnaea* perifériás idegrendszerében

Mindkét fajban gazdag HA-IR beidegzést mutatott az ajak és a talp, emellett a *Helix* ajkában és felső tapogatóiban nagyszámú jelölt sejtet is kimutattunk. A statocysták érzősejtjeinek egy része – hasonlóan a posztembrionális fejlődési állapotokban megfigyeltekhez – továbbra is HA-IR-nak bizonyult. A többi vizsgált perifériás szövetben – a szívben, bukkális izomzatban, a nyálmirigyben, illetve a *Lymnaea* tapogatóiban – nem találtunk HA-IR elemeket.

4.5.2.1. Statocysta

A statocysták az idegrendszert körülvevő kötőszövetes burokból ágyazva a lábdúcok kaudális felszínéhez kapcsolódnak. A bennük elhelyezkedő 13 érző idegsejt többsége, 7-8 idegsejt erős immunreaktivitást mutatott mindkét fajban (12., 13., 14A és 15A-C ábrák). *Lymnaea*-ban e sejtek szenzoros axonjai vékony köteget képezve az azonos oldali fejdúcba vetültek, és ott a neuropil állomány egy kis

területén arborizáltak. Ez a vékony axonköteg tisztán elkülönült a cerebro-pedális konnektívum mellett.

4.5.2.2. Tapogatók, ajak

A *Helix* felső tapogató inak érzőhámjában nagyszámú bipoláris sejtet találtunk. HA-IR érző sejteket figyeltünk meg a felső tapogatók teljes hosszában, denzitásuk különösen magas volt a tapogatók csúcsain, amely terület a szaglóhámnak felel meg. Ezzel szemben a *Lymnaea* tapogatói - amelyek a *Helix* tentaculumaihoz képest jóval redundánsabb anatómiai egységet képviselnek - nem tartalmaztak HA-IR idegelemeket.

A *Helix* ajak régiójának hámjában is számos érző neuront találtunk, melyek apikális dendritjeikkel a hám felszínéhez vetültek. Az ezen sejtekből eredő idegrostok a CNS irányába projiciáltak, és kötegekbe rendeződve futottak az epiteliális réteg alatt. Az ajak izomzatának néhány részében finom, varikózus rostok láthatók, melyek az epiteliális réteg felé futnak. A *Lymnaea* ajkában egy két részre különíthető HA-IR rostrendszer figyeltünk meg: az epithelium mentén vékony, varikózus rostok futottak párhuzamosan annak belső felszínével, míg egy másik, szintén varikózus rostokból álló rendszer helyezkedett el az ajak mélyebben található izomrétegében. Az epiteliális sejtek között vékony HA-IR nyúlványok futottak az ajak felszínére merőlegesen, de HA immunreaktivitást mutató tipikus bipoláris sejteket itt nem találtunk.

4.5.2.3. Talp

A *Helix* lábának izomszöveve varikózus, vékony kötegekbe rendeződő HA-IR axonok hálózatát tartalmazta. HA-IR érző idegsejteket nem tudunk kimutatni. A *Lymnaea* lábában látott Innervációs mintázat részben az ajakban leírtá emlékeztet, jelölt rostkötegek futottak a hámréteggel párhuzamosan, és az ezekből, illetve más kötegekből eredő varikózus nyúlványok voltak jelen a perifériás szövet mélyebb izomszövetében, ahol néhány esetben bipoláris neuronok is előfordultak.

4.6. HA koncentrációk a *Helix* és *Lymnaea* eNS-ében és egyes perifériás szerveiben

HPLC technikával meghatároztuk a HA koncentráció értékeket a *Helix* és *Lymnaea* teljes CNS-ében, az egyes idegdúcokban és a különböző perifériás szövetekben (talp, ajak, tapogató). A teljes *Helix* CNS hozzávetőleg 14 pmol/mg szövet, míg a *Lymnaea* CNS körülbelül 6 pmol/mg szövet HA-t tartalmazott. A legmagasabb értékeket mindkét fajban a lábdúcokban mértük (18,6-47,4 pmol/mg szövet), és a visceró-parietális dúcok komplex tartalmazta a legkevesebb HA-t (4,3-4,8 pmol/mg szövet). A perifériás szövetek HA-tartalma a CNS-ben mértékkel összehasonlítva jelentősen alacsonyabb volt, *Helix*-ben 0,33 pmol/mg szövet (tapogató) és 1,04 pmol/mg szövet (talp) értékek között változott, illetve 0,26 pmol/mg szövet (láb) és 0,46 pmol/mg szövet (ajak) értékek között a *Lymnaea*-ban.

4.7. 3H-HA felvétele és leadása a *Lymnaea* központi idegrendszerében

A *Lymnaea* CNS 3H-HA-t tartalmazó fiziológiás oldatban történő inkubálását követően a radioaktívan jelölt anyag specifikus akkumulációját figyeltük meg az idegszövetben. A 3H-HA felvétele telíthető volt, és a Lineweaver-Burk függvény lefutása egy egykomponensű felvételi folyamatra utal. A kinetikai adatokat elemezve meghatároztuk az akkumulációs folyamat K_m (37,6 JIM) és V_{max} (6,6 pmol/mg szövet/perc) értékeit. A felvett 3H-HA különböző idegdúcok közötti megoszlása a következő volt: fej dúcok - 34,2%, pofadúcok - 11,3%, lábdúcok 18,1 %, visceró-parietális dúcok komplex - 36,3%.

A 3H-HA felvétele különböző inhibitorokkal gátlható volt. A különböző gátlószerek alkalmazása során a következő IC_{50} értékeket kaptuk: ouabain - 314 JIM, imipramin - 146 JIM, dezipramin - 106 JIM, fenoxibenzamin - 28 JIM, benztropin - 22 JIM.

Kimutatható volt, hogy a felvett 3H-HA egy része spontán módon szabadult fel a fiziológiás oldattal való átmosás közben az idegdúcokból. A perfúziós oldatban 100 pM-ra megemelt K^+ koncentráció a felszabadult 3H-HA mennyiségének jelentős, mintegy 50%-os növekedését eredményezte. A 3H-HA K^+ által serkentett felszabadulása Ca^{2+} -függőnek bizonyult, mivel Ca^{2+} -nak a fiziológiás oldatból történő eltávolítása után a 3H-HA felszabadulásának jelentős csökkenését figyeltük meg.

4.8. A HA hatása azonosított központi neuronok aktivitására

A HA hatását a *Helix pomatia* jobb oldali mezocerebrumának és a *Lymnaea stagnalis* jobb fejdúca anterior lebenyének nagy méretű (kb. 70-80 pm) sejtjein, illetve mindkét faj pofadúcának B2 motoneuronjain elemeztük. -100 és -10 mV feszültségértékek közötti tartományban végeztünk voltage-clamp kísérleteket. A sejtek felszínére nyomással adott HA -100 és -50 mV feszültség értékek között egy kifelé irányuló áramot váltott ki. Az áram iránya -39,6 mV feszültségnél fordult meg, és a feszültség érték felett befelé irányult. -80 mV holding potenciálnál 10 mV-onként növekvő lépésekben hiperpolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. A válasz során az áram nagyságában észlelt csökkenés arra utalt, hogy a HA mindkét faj fent említett idegsejtjeinek membránkonduktanciáját csökkentette.

A *Lymnaea* pofadúcának B2 motoneuronján az alkalmazott HA egy befelé irányuló áramot váltott ki -100 és -50 mV feszültség értékek között, amely -50 mV-nál fordult meg. Az áram I-V karakterisztikája lineárisnak bizonyult, és a membránkonduktancia növekedése volt megfigyelhető. A *Helix* B2 motoneuronjában a HA által kiváltott válasz szintén a membránkonduktancia növekedésével volt kapcsolatban, bár az áram amplitúdója a *Lymnaea*-ban megfigyelthez képest nagyon kicsi volt. Ez feltehetően a hibernációs periódussal magyarázható, mivel ezeket a méréseket téli hibernációból felébresztett állatokon végeztük.

4.9. A HA hatása a *Lymnaea* mozgására

Különböző koncentrációkban (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ M) alkalmaztunk HA-t annak eldöntésére, hogy az hatással van-e a *Lymnaea* mozgásaktivitására, azaz befolyásolja-e a talp csillóival végrehajtott csúszó mozgást. Mindhárom alkalmazott HA koncentráció hatásosnak bizonyult, bár a 10⁻³ és 10⁻⁴ M HA koncentráció hatása nem volt egyértelmű, azaz hatásukra mind a mozgás serkentése, mind annak gátlása egyaránt megfigyelhető volt. Ezzel szemben a 10⁻⁵ M koncentrációjú HA minden esetben serkentő hatással volt a csigák csúszó mozgására, ezért e koncentráció hatásait vizsgáltuk részletesen. A kísérletek (n=5) eredményeképpen megállapítható volt, hogy a 10⁻⁵ M koncentrációban alkalmazott HA a kontrollhoz képest mintegy 43%-kal (S.E.M.: 5,7) serkentette az állatok mozgását.

5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. A HAerg rendszer kialakulása és lehetséges szerepe a tüdőscsigák egyedfejlődésében

Immuncitokémiai és HPLC adataink egyértelműen mutatják, hogy HAerg idegsejtek kis populációja már jelen van a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* embriók fejlődő idegrendszerében. Az első két, bilaterális szimmetriájú HA-IR sejtpár a metamorfózis időtartama alatt, a kialakulóban lévő fejdúcoknak megfelelő területen, azok kialakulásának kezdetével egy időben jelent meg (E55% fejlettségi állapot, metamorfózis). Ezeket további 5 sejtpár megjelenése követte az embrionális fejlődés végéig. Az említett 7 sejtpár kizárólag a fej-, pofa- és lábdúcokban lokalizálódott, a CNS-t felépítő többi idegdúcban (fali-, köpeny-, illetve zsigerdúcok), illetve a CNS-en kívül az embriogenezis ideje alatt nem találtunk HA-IR idegelemeket.

A peteburok elhagyását követő posztembrionális fejlődés során a HA-IR neuronpopuláció fokozatos számbeli növekedést mutatott, a posztembrionogenezis végére a HAerg rendszer fejlettsége, a HA-IR idegsejtek száma és eloszlása hasonló volt a felnőtt, ivarérett állathoz. A CNS-en belül a P1-2 posztembrionális fejlődési stádiumokban csak a lábdúcokban jelentek meg újabb HA-IR neuronok, emellett azonban - közvetlenül a peteburok elhagyását követően - a statocysták érző sejtjeinek erős immunpozitivitását figyeltük meg, valamint a talpban is HA-IR nyúlányrendszert láttunk. A P3-4 fejlődési stádiumok alatt a pofa- és lábdúcokban történt jelentős HA-IR sejtszámnövekedés. A fejdúcokban a HA-IR sejtek többsége az utolsó (P5-6) fejlődési stádiumokban jelent meg. Hasonlóképpen a köpeny-, faliés zsigerdúcokban is csak a posztembrionogenezis végére jelentek meg HAerg neuronok, de - az embrionális fejlődés során leírtakkal ellentétben, ahol ezek a ganglionok mentesek voltak a HA-IR elemektől - e dúcok neuropil állományában a posztembrionogenezis alatt egyre erősödő HA-IR beidegzést láttunk.

A HPLC technikával meghatározott HA-tartalom egyedfejlődés során megfigyelhető változásai összhangban voltak a HA-IR neuronok fokozatos megjelenésével és egyre gazdagabb neuropilbeli arborizációjával a metamorfózist követő különböző embrionális fejlettségi állapotokban, illetve a posztembrionális fejlődés egyes stádiumaiban is.

Az első FMRFamid-, dopamin- és szerotonin-IR idegsejtek a *Lymnaea* embriogenezisének igen korai időpontjaiban (E15-30%) jelennek meg. Ekkor a központi idegdúcok még nem alakultak ki, az említett idegsejtek a leendő CNS-en kívül helyezkednek el. Az embrionális szerotonerg, dopaminerg, FMRFamiderg idegsejtek egy része a peteburok elhagyásával elveszti transzmitter fenotípusát, emiatt tranziens sejteknek nevezzük őket. Ezzel szemben a *Lymnaea* embrionális fejlődése alatt tranziens HA-IR neuronokat nem találtunk sem a CNS-en belül, sem azon kívül. Ennek alapján feltételezzük, hogy a HAerg rendszer esetében az extraganglionáris tranziens sejtekhez köthető morfogenetikus hatások nem érvényesülnek. Az igen kései fejlettségi állapotban, egy nappal a kikelés előtt megjelenő oktopaminerg rendszerre ugyancsak jellemző volt a tranziens sejtek hiánya, míg a nitrogén-monoxiderg (NOerg) rendszer kialakulása teljes egészében a posztembrionális fejlődési szakaszra esik. A *Lymnaea* CNS különböző szignálrendszereihez tartozó neuronjainak embriogenezise két alapvető időbeni megjelenési mintázatot mutat: (i) korai (vitorlás lárv) megjelenés, melyet fokozatos sejtszám-beli növekedés, és az arborizációs mintázat kialakulása követ a peteburokból való kikelésig (szerotonin, FMRFamid), (ii) a transzmitter-specifikus neuroncsoport csak az embriogenezis kései stádiumaiban jelenik meg (dopamin, oktopamin). Ezeket a megfigyeléseket a különböző bioaktívanyagok HPLC- vagy rádióimmun technikával történt párhuzamos mérése is alátámasztotta.

Megfigyeléseink alapján úgy tűnik, hogy a HAerg rendszer kialakulása egyik fent leírt fejlődési típusba sem sorolható be. Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy a *Lymnaea stagnalis* HAerg rendszerének kialakulása mind térben, mind időben egy harmadik módon történik, és a kialakulásnak ez a módja a HAerg rendszer döntő szerepét az egyedfejlődés során a szabadon mozgó, aktív táplálékszerző életmódot folytató juvenilis és felnőtt életszakasz idejére prognosztizálja. Az embriogenezis alatt csak a HA-IR idegsejtek kis hányada jelent meg, azaz a felnőtt *Lymnaea* CNS-ben található mintegy 130 HA-IR idegsejt nagyjából egy tized része. Az embrionális HAerg neuronok kizárólag a fej-, láb- és pofadúcokban lokalizálódtak, és csak ezen ganglionok neuropil régiójában mutattak gyenge arborizációt. Az embrionális megoszláshoz hasonlóan, a kifejtett, ivarérett *Lymnaea* HA-IR neuronjainak nagy többsége is a fej-, láb- és pofadúcokban lokalizálódott, de a felnőtt egyedek valamennyi központi idegdúcának neuropil állományában, és a perifériás idegek egy részében is gazdag HA-IR innervációt írtunk le. Felnőtt állatokban a perifériás szövetek egy részét, mint az ajkát és a talpat, szintén HA-IR elemek idegezték be. A lábdúcokhoz kapcsolódó statocystákban is 7-8 IR érző idegsejtet találtunk, hasonlóan más, korábban vizsgált gerinctelen faj okhoz (*Aplysia californica*, *Pleurobranchaea californica*, *Biomphalaria glabrata*). Az ajak, a talp, valamint a statocysta sejtjei is csak a peteburok elhagyását követően mutattak immunjelölést, az embriogenezis során nem találtunk perifériás HA-IR idegelemeket.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az embrionális HAerg rendszer amennyiben egyáltalán bír valamilyen funkcióval az embriogenezis időtartama alatt - specifikus, anatómiailag (szinaptikusan) korlátozott, lokális szerepet játszhat a gangliogenezisben és a korai neuroplasztikus események során.

Egyértelmű, hogy a HAerg rendszer fejlődése nem áll meg a peteburok elhagyásával, kialakulásának fő lépései a poszttembriogenezis időtartama alatt zajlanak le, amikor számos HA-IR neuron(csoport) adódik a központi idegdúcokban a kikelés idejére már jelenlévő rendszerhez, és azokban a ganglionokban (köpeny-, faliés zsigerdúcok) is megjelennek HAerg sejtek, melyekben az embriogenezis alatt hasonlókat nem találtunk. Emellett a perifériás HAerg rendszer is a poszttembriogenezis alatt jelenik meg. Mindezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a juvenilis életszakasz a HAerg rendszer kifejlődésének meghatározó időszaka, melynek során az nem csak végső anatómiai alakját és megoszlását nyeri el, hanem a központi integrációs és perifériás szinten betöltött funkcionális/ szabályozó szerepei is nagy valószínűséggel ebben a periódusban alakulhatnak ki.

5.2. A HAerg rendszer lehetséges szerepe központi és perifériás szabályozó folyamatokban a kifejllett tüdőscsigák esetében

Vizsgálataink eredményei alapján a HA a kifejllett, ivarérett *He/ix pomatia* és *Lymnaea stagnalis* CNS-ében széles körben előforduló szignálmolekulának, transzmitter jelöltnek tekinthető. A Gastropoda idegrendszerrel foglalkozó kutatások sorában munkánk az első, mely a HAerg rendszer lehetséges szerepét multidiszciplináris megközelítéssel elemezte. Immuncitokémiai módszerekkel mind a *He/ix pomatia*, mind a *Lymnaea stagnalis* CNS-ében és egyes perifériás szöveteiben HA-IR idegsejteket, valamint a CNS idegdúcainak neuropil állományában, a perifériás szövetekben és idegekben HA-IR axonnyúlványok sűrű hálózatát mutattunk ki. Az immunjelölt idegelemek száma jól korrelál a HPLC-vel a teljes CNS-ben és az azt alkotó egyes idegdúcokban egyenként mért HA koncentráció értékekkel. A *Lymnaea* CNS-ben demonstráltuk egy specifikus HA felvételi-leadási rendszer jelenlétét; elektrofiziológiai módszerekkel pedig kimutattuk a HA specifikus, egyes CNS-beli idegsejtek membránjára gyakorolt hatását; végül viselkedés teszttel bizonyítottuk, hogy a HA serkenti a *Lymnaea* mozgásaktivitását, feltehetően az állat mozgásáért felelős csillós hámsejtek aktivitásának befolyásolása útján. Mindezen eredmények, és a *Helix-en* korábban leírt biokémiai megfigyelések egyértelműen arra utalnak, hogy a HA fontos és széles körű jelátvivőnek tekinthető az általunk vizsgált tüdőscsigák idegrendszerében.

A *He/ix* és a *Lymnaea* CNS-ében a HA-IR idegsejtek eloszlása hasonló volt, bár számuk jelentős mértékben eltért. Az összes HA-IR neuron száma 400 körüli volt a *Helix-ben*, és mintegy 130 a *Lymnaea* CNS-ében. Ugyanakkor a jelölt sejtek túlnyomótöbbsége mindkét vizsgált fajban a pofa-, fej- és lábdúcokban lokalizálódott, míg a garatkörüli dúckomplexekben jóval kevesebb immunreaktív idegsejtet találtunk. Az összes központi idegdúc neuropil állományában sűrű, varikózus rostrendszert, az egyes idegdúcokat összekapcsoló konnektívumokban és kommisszúrákban pedig számos jelölt axonnyúlványt figyeltünk meg, ami a HA-tartalmú idegsejtek intra- és interganglionáris integratív folyamatokban betöltött szerepét jelzi. Az immuncitokémiai kísérletekben általunk is használt ellenanyag alkalmazásával HA-IR idegsejtek jelenlétét mutatták ki más puhatestű fajokban is, például a *Macoma bivalvica* nevű kagylóban és az Opisthobranchiata csoportba tartozó *Aplysia californica* és *Pleurobranchaea californica* csigafajokban, de ezen utóbbi fajok CNS-ében jóval kisebb számú jelölt sejt volt, mint az általunk vizsgált tüdőscsigáikéban.

Voltage-clamp kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a HA karakterisztikus változásokat képes létrehozni a *Helix* és a *Lymnaea* azonosított központi neuron

jának membránkonduktanciájában (*Helix* – jobb oldali mezocerebrum sejtjei, a pofadúc B2 motoneuronja; *Lymnaea* – fejdúc anterior lebenye, pofadúc B2 motoneuronja). A HA különböző sejtek membránpotenciáljára gyakorolt ellentétes hatása felveti e monoamin az idegrendszerben betöltött sokrétű szerepét, míg a

vizsgált neuronok befelé és kifelé irányuló ionáramainak regisztrált reverzál potenciáljai azok nem-specifikus ionfüggésére utalnak. A HA alkalmazását követően megfigyelt eltérő válaszok különböző HA receptor altípusok jelenlétét valószínűsítik. Emellett kimutatták, hogy a HA stimulálja az adenilát-cikláz aktivitást, és növeli a cAMP szintet a *Lymnaea* CNS-ében. *Aplysia-ban* két HA receptor típust (H1, H2) találtak, és leírták az azonosított C2 HAerg idegsejt preszinaptikus gátló hatását is. Bár a HA receptor típus(ok) és a pontos ionmechanizmusok tisztázásához további kísérletek szükségesek, az a tény, hogy a HA ezen fiziológiásan azonosított központi neuronokban membránszinten jellemző változásokat idéz elő, jelzi, hogy a HA részt vesz a tüdőscsigák különböző magatartásformáit kialakító idegsejtek aktivitásának szabályozásában. A tüdőscsigák bukkális ganglionjának B2 motoneuronja a táplálkozást szabályozó idegsejt hálózat tagja, míg a mezocerebrális sejtek a *Helix-ben* és a fej dúc anterior lebenyének sejtjei a *Lymnaea-ban* a szexuális (párási) viselkedés kialakításában vesznek részt. Megállapították, hogy az *Aplysia* fejdúcában található HAerg C2 idegsejt az ajakból fogadott információkat, és szerepet játszik a táplálkozási viselkedés szabályozásában.

Óriásneuronok sem a *Helix-ben*, sem a *Lymnaea-ban* nem mutattak HA immunreaktivitást, a *Helix* MGC idegsejtjének kivételével, mely néhány esetben jelölődött. Intracelluláris jelöléssel és biokémiai módszerekkel korábban azonosítottak egy óriás HAerg idegsejtet a *Lymnaea* zsigerdúcának anterio-dorzális régiójában. Ezzel ellentétben mi mindössze 4 darab közepes méretű HA-IR neuront találtunk ebben a

ganglionban. *Aplysia* CNS-ben összefüggést mutattak ki a radioaktívan jelölt HA celluláris lokalizációja és az immunjelölés között. A zsigerdúcban található óriásneuronok jelölődésének hiánya inkább a transzmitter-specifikus sejtek azonosítására egyedül használt autoradiográfiás módszer alacsonyabb specifikitását jelezheti. *Helix-ben* az elhelyezkedése alapján azonosított szerotonerg MGC óriásneuron csak a kísérletek egy részében mutatott immunreaktivitást, amit *Lymnaea-ban*, *Aplysia*-ban vagy *Pleurobranchaea-ban* eddig még nem figyeltek meg. Lehetséges, hogy az MGC idegsejt HA tartalma évszakos változást mutat, amint azt *Helix-ben* a központi és perifériás (nyálmirigy) szerotonin-tartalom esetében korábban kimutatták.

A HA fontos hírvívő molekula lehet a *Helix* és a *Lymnaea* bizonyos perifériás területein, mint például a tapogatóban, ajakban, talpban és a statocystákban. A HAIR idegelemek sűrű előfordulása és anatómiai jellemzői a HAerg sejtek mind érző, mind mozgató folyamatokban való részvételét valószínűsíti. HPLC technikával elemezve alacsony, de mérhető HA koncentrációkat mutattunk ki a fent említett perifériás szövetekben. Más perifériás szövetek, mint például a nyálmirigy, bukkális izomzat, garat, nyelőcső és a szív, nem mutattak HA-IR beidegzést. A vizsgált perifériás szövetekben a HA-IR idegelemek eloszlási mintázata részben eltérő volt a két fajban. Míg a *Helix* ajkában és felső tapogatóinak hámrétegében számos IR érző neuront találtunk, egyik faj talpa és a *Lymnaea* ajka sem tartalmazott

immunreaktív érző idegsejteket. Ugyanakkor egyfajta kettős beidegzést figyeltünk meg bennük: egyrészt szubepiteliális rostkötegek voltak jelen, melyek igen finom nyúlványokkal részben a hámrétegbe is vetültek, másrészt egy mélyebben, az izomszövetben arborizáló, immunreaktív rostrendszer is megfigyeltünk. A *Lymnaea* tapogatóiban HA-IR idegelemek nem voltak kimutathatók. A bipoláris HA-IR sejtek jelenléte a *Helix* felső tapogatóiban és ajkában felveti a HA kemoszenzitív szerepének lehetőségét, míg a talp innervációs mintázata a HA mozgató (neuromuszkuláris) folyamatokban játszott szerepére utal.

A *Lymnaea* talpában megfigyelt HA-IR beidegzés emlékeztet a szerotonin-IR idegelemek korábban leírt eloszlására, ugyanis szerotonerg idegnyúlványokat találtak a talpban, melyek részben közvetlenül a hámréteg alatt, részben pedig a talp mélyebb szövetrétegeiben koncentráálódtak. Ennek alapján feltételezik, hogy a szerotonin részt vesz a talp csillós hámsajtjei aktivitásának szabályozásában, ami a *Lymnaea* (csúszó) mozgásáért felelős. Saját vizsgálataink alapján a 10-5 M koncentrációban alkalmazott HA serkentette a *Lymnaea* mozgásaktivitását, ami felveti a HA közvetlen szerepét a talp ciliáris motilitásának szabályozásában.

Az általunk vizsgáltakkal azonos törzshe tartozó Opisthobranchiata fajok *Aplysia californica* és *Pleurobranchaea californica* - ajkában és talpában szintén találtak HA-IR elemeket, emellett jelölt rostokat mutattak ki az anterior és posterior tapogatókat körülvevő kötőszövetben is. Az *Aplysia* radulája és szájürege érzőstruktúrákra emlékeztető HA-IR elemeket tartalmaz. A *Macoma bivalvica* nevű kagyló testfalában, szifójában, kopolyájában és nyelőcsővében is kimutattak HA-IR érzősejteket.

Ezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a HA-nak a különböző haslábuak idegrendszerében különböző, fajspecifikus funkció(i) lehet(nek). A szárazföldi tüdőscsiga *Helix pomatia*-ban a HA valószínűleg szerepet játszik a kemoszenzációban, valamint a mozgás irányításában is részt vesz. Ezzel szemben az édesvízi tüdőscsiga *Lymnaea stagnalis*-ban a HA szerepe a periférián főleg efferens feladatok végrehajtásának szabályozásában valószínűsíthető. A tengeri haslábu *Aplysia californica* és *Pleurobranchaea californica* fajok perifériás szöveteiben jóval kisebb a HA-IR idegelemek előfordulási gyakorisága, ebből következően a HA érző és mozgató funkciója az általunk vizsgált fajokéhoz képest nagy valószínűséggel sokkal inkább behatárolt. Különböző rovarfajok HA-IR idegsejtjeinek morfológiai jellemzői és projekciós mintázatai alapján a HA fajspecifikus szerepét a rovarok agyában is felvetették.

A periférián a statocysta bizonyult az egyetlen olyan szenzoros szervnek, amely hasonló HA-IR innervációt mutatott, és hasonló számú HA-IR érzősejtet tartalmazott az összes eddig vizsgált Gastropoda fajban. A *Helix* és *Lymnaea* statocystáiban 7-8 érzősejt bizonyult HA-immunreaktívnak, jelezve, hogy a HA mechanoszenzoros folyamatokban is részt vesz. Az *Aplysia*-hoz és *Pleurobranchaea*-hoz hasonlóan mi is immunjelölt idegrostokat tudunk kimutatni a statocysta idegben, ám ezen túlmenően követni tudtuk azok lefutását az idegben, és lokalizálni lehetett arborizációjukat a fej dúc neuropil régiójának egy meghatározott részletében, ami feltehetőleg a statocysta érző sejtjeinek egyes cerebrális idegsejtekkel való szoros kapcsolatára utal.

Összefoglalásképpen tehát megállapíthatjuk, hogy a *Helix pomatia* és *Lymnaea stagnalis* tüdőscsiga fajok idegrendszerében a HA valószínűsíthetően széleskörű szabályozó - érző, mozgató és integratív - szerepet játszik. A CNS ganglionjainak neuropil állományában, az idegdúcokon keresztül futó idegkötegekben, illetve a

CNS ganglionáris alegységeit összekapcsoló konnektívumokban és kommisszúrákban jelen lévő, sűrűn rendeződött varikózus rostrendszer a HA különböző, inter- és intraganglionáris szerepeit jelzi. A HA nagy valószínűséggel központi szinten vesz részt az afferens információk feldolgozásában, és egyes perifériás célszervek működését szabályozó folyamatokban. Bár a HA-IR idegsejtek nagy többsége a fej-, pofa- és lábdúcokban koncentrálódik, a visceroparietális dúckomplexet kialakító ganglionok neuropil állományának gazdag HA-IR innervációja arra enged következtetni, hogy a HA részt vesz az ezen ganglionokkal kapcsolatban lévő perifériás folyamatok - mint például a szív aktivitása - szabályozásában. A HA feltehetően hírvivő molekula egyes perifériás területek (fej, láb) érző (szaglás, ízérzékelés), illetve motoros (neuromuszkuláris, talp csillói) folyamataiban is.

Eredményeink olyan új információkkal szolgálnak a HA-IR rendszer központi és perifériás szerveződéséről, melyeket tüdőscsiga fajokban eddig még nem írtak le, ugyanakkor a gerinctelenek aminerg szabályozásával kapcsolatos ismereteinket is gazdagítják. A jövőben ezek az adatok a HA-IR jelátvitel további részletes leírásának alapjául szolgálhatnak, különös tekintettel az intracelluláris jelátviteli folyamatokra, illetve a HA-receptorok azonosítására. Az a tény, hogy HA jelenlétét sikerült kimutatni mind érző idegsejtekben, mind efferens célszervekben, lehetőséget kínál e monoamin perifériás funkcióinak Gastropodákban eddig nem ismert szerepének tisztázására is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

1.

A nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* L (Pulmonata, Gastropoda) embrióiban és juvenilis egyedeiben vizsgáltuk a HA-IR rendszer kialakulását, immuncitokémiai és biokémiai (HPLC) módszereket alkalmazva.

2.

A *Helix pomatia* és *Lymnaea stagnalis* tüdőscsiga fajok kifejlett egyedeinek központi és perifériás idegrendszerében - immuncitokémiai módszerek, HPLC elemzések, felvételi- és leadási kísérletek, voltage-clamp technika és viselkedési (mozgás) teszt segítségével - vizsgáltuk a HA-tartalmú idegsejtek eloszlását, kémiai-neuroanatómiáját, biokémiai tulajdonságait és a HA lehetséges fiziológiai hatásait.

3.

Embriológiai vizsgálataink során a következő fontos megfigyeléseket tettünk:

- (i) A HA-IR idegsejtek lokalizációja azok első megjelenésétől kezdve az embriogenezis végéig a láb-, fej- és pofadúcokra korlátozódik. Az embrionális fejlődési stádiumokban hiányoznak a felnőtt állatokban megfigyelhető immunreaktív perifériás projekciók. Tranziens HA-IR neuronokat sem a CNS-en belül, sem a periférián nem találtunk. Az első HA-IR neuronok a fejlődő fejdúcokban jelennek meg az E55%-os embrionális fejlettségi állapotban, a metamorfózis alatt. Az embriogenezis végére összesen 7 HA-IR sejt pár figyelhető meg a CNS-ben.
- (ii) A posztembriogenezisre a HAerg rendszer folyamatos fejlődése jellemző, számos további HA-IR sejt(csoport) jelenik meg a fejlődő garatkörűli gangliongyűrűt alkotó idegdúcokban. A legjelentősebb sejtszámnövekedés a P2-3 stádiumokban következik be. Megjelennek a perifériás HA-IR idegelemek is.
- (iii) HPLC technikával végzett méréseink eredményei jól korrelálnak immuncitokémiai megfigyeléseinkkel: a HA-IR idegelemek számának növekedésével összhangban emelkedik az egyes fejlődési stádiumokban mérhető szöveti HA-tartalom.

4.

A HA-IR idegsejtek eloszlási mintázata mindkét faj felnőtt, ivarérett egyedeinek CNS-ében hasonló, bár számuk jelentős eltérést mutat. *Helix*-ben nagyjából 400, míg *Lymnaea*-ban hozzávetőleg 130 jelölt sejtet tudtunk láthatóvá tenni, melyek többsége a pofa-, fej- és lábdúcokban lokalizálódik. A

perifériás szövetek egy részében – mindkét faj ajkában és talpában, illetve a *Helix* felső tapogatóiban – gazdag HA-IR beidegzés található, a tapogató és az ajak számos érző idegsejtet tartalmaz. A statocysták 7-8 HA-IR érzősejtet tartalmaznak.

5.

A HPLC technikával elemzett HA koncentráció értékek 4,8 és 47,4 pmol/ mg közötti tartományba esnek a *Helix* CNS különböző ganglionjaiban, és 4,3-18,6 pmol/mg közé a *Lymnaea* CNS-ben, míg a különböző perifériás szövetek 0,33-1 pmol/ mg HA-t tartalmaznak. *Helix*-ben, ez az érték *Lymnaea*-ban 0,26-0,46 pmol/mg. A HPLC adatok korrelálnak a HA-IR idegelemek számával.

6.

A *Lymnaea* CNS-ben kimutattuk egy nagy affinitású, egy komponensű 3H-HA uptake rendszer jelenlétét (affinitás: 37,6 pM), ami szintén a HA transzmitter szerepét támasztja alá. A felvétel az általunk alkalmazott farmakonokkal gátolható. A 3H-HA felszabadulása kiváltható elektromos ingerléssei és 100 mM K⁺-mal, míg Ca²⁺-mentes fiziológiás oldatban gátlódik.

7.

A voltage-clamp kísérletek eredményei szerint a HA specifikus változásokat vált ki a *Helix* és *Lymnaea* egyes azonosított központi neuronjainak membránkonduktanciájában.

8.

Exogén, 10⁻⁵ M koncentrációban alkalmazott HA serkenti a *Lymnaea* mozgásaktivitását, a talp csillós hámsejtjeivel végrehajtott csúszó mozgást.

9.

Eredményeink a szakirodalomban elsőként bizonyították, hogy a HA fontos jelátvivő szerepet játszik a Gastropoda idegrendszer mozgató, érző és integratív funkcióiban egyaránt.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Hegedűs E, Kaslin J, Hiripi L, Kiss T, Panula P, Elekes K (2004) Histaminergic neurons in the central and peripheral nervous system of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): immunocytochemical, biochemical and electrophysiological approach. *J. Comp. Neurol.* 475:391-405.

""

Hegedűs E, Kaslin J, Elekes K (2004). Embryogenesis of the histaminergic system in the land snail, *Lymnaea stagnalis* L: an immunocytochemical and biochemical study. *Acta Biol. Hung.* 55:301-313.

A disszertáció témájához kapcsolódó konferencia előadások, poszterek, előadáskivonatok

Hegedűs E, Hiripi L, Nagy L, Elekes K: A histaminergic system in the CNS of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*). VIII. MITT Konferencia, Szeged, 2001 (*Neurobiology* 9:192).

Hegedűs E, Hiripi L, Nagy L, Elekes K: A histaminergic system in the CNS of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): immunocytochemical and biochemical characterisation (poster presentation). 28th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen. 2001 (*Göttingen Neurobiology Report* 2001, p. 780).

Hegedűs E, Kaslin J, Panula P, Elekes K: Histaminergic neurons in the peripheral nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*). IBRO Workshop, Debrecen, 2002 (*Neurobiology* 9:315-316).

Hegedűs E, Kaslin J, Hiripi L, Panula P, Elekes K: A histaminergic system in the CNS and PNS of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): immunocytochemical and biochemical characterization (poster presentation). FENS Forum, Paris, 2002 (*European Journal of Neuroscience*, Suppl., Abstract #228.8)

Hegedűs E, Elekes K: Embryogenesis of the histaminergic system in the land snail, *Lymnaea stagnalis* L: an immunocytochemical approach. A MITT IX Konferenciája, Balatonfüred, 2003 (*Clinical Neuroscience, Ideggyógyászati Szemle*, 56.,2. különszám, Absztrakt, p. 34.).

Hegedűs E, Hiripi L, Kiss T, Kaslin J, Panula P, Elekes K: Histaminergic system in the CNS and PNS of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): immunocytochemical, biochemical and electrophysiological characterization. MAT XII. Anatómus Kongresszusa, Budapest, 2003.

Hegedűs E, Hiripi L, Kiss T, Kaslin J, Panula P, Elekes K: Histaminergic system in the CNS and PNS of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): immunocytochemical, biochemical and electrophysiological characterization. 10th ISIN Conference, Tihany, 2003.